

**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR G  
Internationales  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTL  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF D



(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C07H 1/08</b>		<b>A1</b>	(11) Nr. <b>WO 9608500A1</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>21. März 1996 (21.03.96)</b>	
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP95/00392</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: <b>3. Februar 1995 (03.02.95)</b></p> <p>(30) Prioritätsdaten: <b>P 44 32 654.8 14. September 1994 (14.09.94) DE</b></p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>QIAGEN GMBH [DE/DE]; Max-Volmer-Strasse 4, D-40724 Hilden (DE).</b></p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>COLPAN, Metin [TR/DE]; Uhlandstrasse 5, D-45219 Essen (DE).</b></p> <p>(74) Anwälte: <b>MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).</b></p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: <b>AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b></p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: <b>PROCESS AND DEVICE FOR ISOLATING CELLULAR SUBSTANCES SUCH AS NUCLEIC ACIDS FROM NATURAL SOURCES</b></p> <p>(54) Bezeichnung: <b>VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR ISOLIERUNG VON ZELLINHALTSSTOFFEN WIE NUCLEINSÄUREN AUS NATÜRLICHEN QUELLEN</b></p> <p>(57) Abstract</p> <p>A filtration process is disclosed for preparing nucleic acids from natural sources. The nucleic acid-containing sources are disintegrated, the disintegrated product is left to rest for a certain time, the resulting disintegrated product is passed through a filtering layer made of glass, silica gel, aluminium oxide or powdery diatomaceous earth or non wovens of interwoven or glued glass fibres and silica gel, cellulose, paper, pressed paper, non wovens of paper, particles, layers, membranes or plastics, such as non woven fabrics based on polypropylene. The fraction that passes through the filtering layer is collected and the nucleic acids are isolated from the collected fraction and purified.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Filtrationsverfahren zur Präparation von Nucleinsäuren aus natürlichen Quellen, wobei die nucleinsäurehaltigen Quellen aufgeschlossen werden, der Aufschluß für einen Zeitraum ruht, der resultierende Aufschluß eine Filterschicht aus Glas, Silicagel, Aluminiumoxid oder geschütteter Diatomeenerde oder verwebten oder verklebten Vliesen aus Glasfasern und Silicagel sowie Cellulose, Papier, gepreßtem Papier, Vliesen aus Papier oder auch Partikel oder Schichten, Membranen oder Kunststoffe, wie non woven fabrics, basierend auf Polypropylen, passiert, die aus der Filterschicht austretende Fraktion aufgefangen wird und anschließend die Nucleinsäure aus der aufgefangenen Fraktion isoliert und gereinigt wird.</p>			

### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren und Vorrichtung zur Isolierung von Zellinhaltsstoffen wie Nucleinsäuren aus natürlichen Quellen

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Präparation von Nucleinsäuren aus natürlichen Quellen, wie z. B. E. coli Zellen, humanen und tierischen Zellen durch Abtrennung der aufgeschlossenen natürlichen Quellen, wie Zellen oder Zelltrümmer, in einer Probe durch Filtration sowie Zusammenstellung enthaltend Hilfsmittel für die Durchführung des Verfahrens.

Bei der Präparation von Zellinhaltsstoffen, insbesondere von Nucleinsäuren, stellt sich oft das Problem, die aufgeschlossenen natürlichen Quellen, aus denen diese Inhaltsstoffe stammen, von den gelösten Stoffen zu trennen. Üblicherweise erfolgt die Abtrennung der Zellen oder Zelltrümmer mittels Zentrifugation, wobei sich die Zelltrümmer oder Zellen als Pellet im Zentrifugationsröhrchen abscheiden. Die gelösten Inhaltsstoffe finden sich dann im Überstand und können pipetiert werden. Bei der Präparation von Nucleinsäuren zur Abtrennung der aufgeschlossenen Zellen oder deren Bruchstücke konnten sich einfache Filtrationsverfahren nicht durchsetzen, da die Zelltrümmer entweder durch die zu grobporigen Filter durchlaufen und somit für Trübungen und Verunreinigungen im Filtrat sorgen oder bei Verwendung von Filtern mit entsprechend engen Poren es jedoch zwangsläufig zur Verstopfung

- 2 -

der Filter kommt, so daß eine sinnvolle Präparation der Zellinhaltsstoffe nicht mehr möglich ist.

Der vorliegenden Erfindung liegt mithin das Problem zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen und eine Vorrichtung zu schaffen, mit deren Hilfe Zentrifugationsschritte zur Präparation von Zellinhaltsstoffen aus natürlichen Quellen, wie Zellen, vermieden werden können durch einfacher zu handhabende Filtrationsschritte.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem wird gelöst durch ein Verfahren gemäß den Merkmalen des Anspruchs 1. Die sich daran anschließenden Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die erfindungsgemäße Zusammenstellung weist die Merkmale des Anspruchs 13 auf.

Um Inhaltsstoffe aus Zellen zu isolieren, werden diese üblicherweise zunächst aufgeschlossen. Bei der Präparation von Nucleinsäuren müssen die Zellen beispielsweise zunächst durch die Verwendung von Enzymen, wie z. B. Proteinase K, Lysozym und Detergenzien wie SDS, Brij, Triton X 100, Tween 10, DOC und Chemikalien wie Natriumhydroxid, Guanidin-Hydrochlorid und Guanidin-Isothiocyanat aufgeschlossen werden. Die Zellbruchstücke werden durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand dekantiert oder abpipettiert und anschließend durch eine Chromatographie oder Extraktion mit Phenol oder Chloroform und einer Alkoholfällung gereinigt. Maniatis; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. et al., eds. (1991) Wiley Interscience, New York; Birnboim H.C. and Doly, J. (1979) A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, pp 1513 - 1522.

Diese Zentrifugation in einer in Laboratorien üblichen Zentrifuge, z. B. Heraeus Biofuge GL, Beckmann GS6 dauert zwischen 15 min und 2 h bei 3.000 rpm bis 20.000 rpm, je nach

- 3 -

Anwendungsfall und Partikelgröße der Zellbruchstücke. Daraus ergibt sich, daß bei großen Probenzahlen die Zentrifugation einen großen Personalaufwand und Zeitverluste bedeutet. Es ist daher wünschenswert, ein einfaches und schnelles Verfahren zur Entfernung der Zellbruchstücke zur Verfügung zu haben.

Die bisher verfügbaren Filtermaterialien und Filtrationsmethoden haben sich in Vorversuchen nicht zur Abtrennung dieser biologischen Zelltrümmer geeignet. Sterilfilter aus z. B. Nylon oder Celluloseacetat mit Porengrößen von 0,2  $\mu\text{m}$  oder 0,45  $\mu\text{m}$  verstopfen sofort und besitzen keine Kapazität, eine größere Menge an Zellbruchstücken zurückzuhalten. Diese Filter eignen sich lediglich zur Filtration von Flüssigkeiten mit einem nur sehr geringen Feststoff oder zellulären Kontaminationen.

Das erfindungsgemäße Filtrationsverfahren zur Präparation von Nucleinsäure aus natürlichen Quellen geht davon aus, daß die nucleinsäurehaltigen Quellen zunächst aufgeschlossen werden. Der Aufschluß wird für einen Zeitraum ruhen gelassen. Vorzugsweise beträgt die Ruhezeit mindestens 1 Minute, besonders bevorzugt sind 5 bis 10 Minuten. Der resultierende Aufschluß passiert dann eine Filterschicht aus Glas, Silicagel, Titanoxid, Aluminiumoxid oder geschütteter Diatomeenerde oder verwebten oder verklebten Vliesen aus Glasfasern und Silicagel sowie Cellulose, Papier, gepreßtem Papier, Vliesen aus Papier oder auch Partikel oder Schichten, Membranen oder Kunststoffe, wie beispielsweise non woven fabrics, basierend auf Polypropylen. Die aus der Filterschicht austretende Fraktion wird danach aufgefangen und anschließend die Nucleinsäure aus der aufgefangenen Fraktion isoliert und gereinigt.

Insbesondere mit einer geschütteten Filterschicht aus Silicagel mit einer Partikelgröße von 15 - 30  $\mu\text{m}$  lassen sich

- 4 -

Zellbruchstücke erfolgreich und ohne Verstopfen des Filters zurückhalten und es kann ein klares Lysat erhalten werden.

Die Filterschichten sind vorzugsweise so modifiziert, daß keine Affinität zu Nucleinsäuren besteht. Insbesondere sind Hydroxyl-Gruppen tragende Mineralien oder beschichtete Materialien wie Diol-Silicagel, Diol-Diatomeenerde und/oder Diol-Perlite geeignet.

In einer bevorzugten Ausführungsform kann der Fluß der Probe durch die Filterschicht durch Anlegen eines Überdrucks oder Unterdrucks erleichtert werden. Durch die Konfiguration der Porengröße der Filterschicht ist jedoch auch ein Durchgang der zu filtrierenden Probe durch die Filterschicht, getrieben durch die Schwerkraft, möglich. Desweiteren kann auch, zur Beschleunigung des Passierens der Probe durch die Filterschicht, die Probe durch Zentrifugation durch die Filterschicht befördert werden.

Als Filterschichten werden z.B. Silicagel, Glas oder Diatomeenerde mit Partikelgrößen zwischen 5  $\mu\text{m}$  und 100  $\mu\text{m}$  verwendet. Die besonders bevorzugte Filterschicht ist unbehandelte Diatomeenerde oder modifizierte Diol-Diatomeenerde mit Fließwerten von 0,1 bis 15 Darcy.

Die nucleinsäurehaltigen Quellen können Zellen aus Zellkulturen, Gewebe jedweder Art, Körperflüssigkeiten oder Mikroorganismen bestehen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere zur Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli, Hefe oder eukaryontischen Zellen oder genomischer DNA aus Blut oder Zellen mit einer Größe von 1 bis 50 Kb geeignet. Das erfindungsgemäße Verfahren ist auch geeignet Plasmid-DNA, Cosmid-DNA, insbesondere für die molekularbiologische Forschung, wie Klonierung und Sequenzierung, Plasmid-DNA zur Gentherapie,

- 5 -

genomische DNA zur Analyse, Diagnostik und Gentherapie und/oder virale Nucleinsäuren zu reinigen.

Der Überdruck auf der Seite vor der Passage durch die Filterschicht wird vorzugsweise mittels eines Kolben durchgeführt.

Vorzugsweise schließen sich an die Filtrierung weitere Aufarbeitungsschritte, wie Trennung an Anionenaustauschern und/oder Adsorption und Desorption von anderen mineralischen Trägern an.

Eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens besteht aus einem Hohlkörper, in dem die Filterschicht angeordnet ist. Die Filterschicht ist vorzugsweise zwischen zwei Fixiereinrichtungen angeordnet. Als Hohlkörper kommt insbesondere ein Spritzenkörper in Betracht.

Als Filterschichten, die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden können, kommen Schichten in Form von Schüttungen, insbesondere aus Glas, Silicagel, Titanoxid, Aluminiumoxid oder Diatomeenerde, z. B. Cellit oder Silicagel oder Perlite, in Frage aber auch verwebte oder verklebte Vliese aus Glasfasern sowie Silica sowie Papier, gepreßtem Papier, Vliesen aus Papier oder auch Partikel oder Schichten, Membranen oder Kunststoffe, wie beispielsweise non woven fabrics, basierend auf Polypropylen oder Kombinationen davon zum Aufbau der Filterschicht in Betracht. Andere zur Filtration geeignete Partikel aus Mineralien oder synthetische Polymere, Diatomeenerde, Silicagel, Perlite und andere mineralische Träger sind entweder nicht behandelt oder so behandelt, daß sie eine hydrophile Oberfläche besitzen, die Nucleinsäuren kaum zu adsorbieren vermag, z. B. Diol modifizierte Diatomeenerde.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden gleichzeitig mehrere Proben aufgearbeitet

- 6 -

und durch entsprechende Vorrichtungen, die in vorteilhafter Weise an Mikrotitrationssysteme adaptiert sind, geführt.

Eine geeignete Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht aus einem vorzugsweise zylindrischen Hohlkörper mit Einlaß- und Auslaßöffnung sowie einer Filtrationseinrichtung, die im Hohlkörper angeordnet ist. Zur Fixierung der Filtrationseinrichtung können übliche Befestigungsmittel dienen, wie beispielsweise Verklebungen oder aber auch Fixierung durch Reibungskräfte, indem die Filtrationseinrichtung im Hohlkörper eingeklemmt ist.

Die Vorrichtung besteht aus mindestens einer Filterschicht mit gleicher Porengröße in Richtung der Auslaßöffnung 60 gesehen. Die Figur 1 zeigt eine besonders bevorzugte Variante der Vorrichtung, indem im vorzugsweise zylindrischen Hohlkörper 40 die Filtrationseinrichtung 70 aus einer Schicht gestaltet ist. Die Partikelgröße der Filterschicht liegt im Bereich von 5  $\mu\text{m}$  bis 500  $\mu\text{m}$  bei einer gesamten Dicke der Filterschicht von 0,1 bis 200 mm.

Es kann vorteilhaft sein, eine zusätzliche Schicht 23 in dem Hohlkörper 40 anzuordnen, und zwar oberhalb und/oder unterhalb der Schicht 20, die ein vorzeitiges Eindringen der zu filtrierenden Lösung in den Filter oder das Austreten der Lösung aus der erfindungsgemäßen Vorrichtung verhindert.

Es ist jedoch möglich, die Schicht 20 als poröse, hydrophobe Schicht auszubilden. Ist die hydrophobe Trennschicht 23 oberhalb der Trennschicht 20 angeordnet, ist es vorteilhaft, wenn die Porengröße dieser Trennschicht nicht kleiner als diejenige der darunterliegenden Schicht 20 ist. Dieses Erfordernis ist bei der anderen Konfiguration, wobei die hydrophobe Trennschicht unterhalb der Schicht 20 angeordnet ist, nicht so kritisch.



- 7 -

Vorzugsweise weist die Vorrichtung einen Kolben 80 auf, über den ein Druck im Hohlkörper 40 aufgebaut werden kann, wodurch die Passage der Probe durch die Schicht 20 beschleunigt wird.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Vorrichtung mit weiteren zur Nucleinsäurepräparation notwendigen Instrumenten kombinierbar, wie sie z.B. in der P 41 39 664 offenbart sind.

Die P 41 27 276 offenbart Anionenaustauscher, die in eine Membran eingebettet (3M Empore-Membran) sind. Diese Systeme sind unter der Bezeichnung QIAwell® handelsüblich.

#### Beispiel 1

##### Synthese von Diol-Diatomeenerde

100 g Diatomeenerde werden mit 2.000 ml 10 % Glymo (g-Glycido-Oxypropyltrimethoxysilan) in Toluol oder Tetrachlorkohlenstoff gemischt und entgast und 6 Stunden Rückfluß gekocht.

Die entstandene Epoxy-Diatomeenerde wird abgesaugt und mit Toluol und anschließend Methanol und Wasser gewaschen.

Zur Herstellung der Diol-Form wird die Epoxy-Diatomeenerde mit 10 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /Wasser 3 h unter Rückfluß gekocht.

Die entstandene Diol-Diatomeenerde wird gründlich mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Die getrocknete Diol-Diatomeenerde wird direkt zur Filtration eingesetzt. Die Diol-Diatomeenerde kann durch andere Synthesevorschriften, wie sie in der Literatur beschrieben werden, synthetisiert werden.

### Beispiel 2

#### Filter für Fermenter Kulturen

Eine ca. 2.000 ml Chromatographiesäule (10cm x 25cm) wird am unteren Ende mit einer passenden 50  $\mu$ m PE-Fritte oder einem Nylon-Netz verschlossen und 5 cm hoch mit Diol-Diatomeenerde gefüllt. Die Diol-Diatomeenerde wird mit einem sehr groben Filtertuch (ca. 150 - 200  $\mu$ m) abgedeckt. 2 Liter E. coli Zell-Lysat (Hergestellt aus Lyse von 1 vol. E. coli Zellen in TE mit 1 vol. 0,1 M NaOH/1 % SDS und Neutralisation mit 1 vol. 3M Kalium-Acetat, pH 4.5) werden in die Filtersäule gefüllt und 15 Min. ruhen gelassen. Das Filtrat wird durch die untere Säulenöffnung mit einer Schlauchpumpe abgepumpt und direkt durch eine Anionenaustauscher-Chromatographiesäule mit DEAE-Sepharose FF (Pharmacia) geleitet.

### Beispiel 3

Eine 15 ml PE-Einmalspritze (Durchmesser: 1,5 x 15 cm) wird nach Abbildung 1 unten mit einer porösen 50  $\mu$ m PE-Fritte verschlossen und 1 cm hoch mit 15 - 25  $\mu$ m Silicagel gefüllt und oben wiederum mit einer 50  $\mu$ m Fritte verschlossen. Eine 100 ml E.coli Zellkultur wird abzentrifugiert und in 5 ml TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5) resuspendiert und durch Zugabe von 1 Vol. 0,1 M NaOH / 1 % SDS lysiert. Die Zell-Lyse wird durch Zugabe von 1 Vol. 3 M Kaliumacetat, pH 4,8 gestoppt und das Zell-Lysat inklusive der ausgefallenen Proteine, K-Dodecylsulfat, genomische DNA und Zellbruchstücke in die Filtersäule gefüllt. Das Zell-Lysat ruht 10 min, wobei die leichteren Zellbruchstücke, Proteine und das ausgefallene KDS nach oben steigen. Diese Inkubation verhindert ein vorschnelles Verstopfen der Filterschicht mit den Zellbruchstücken und erhöht somit die Schmutzaufnahme und Rückhaltekapazität der Filterschicht um das Mehrfache. Mit einem Kolben wird das Filtrat durch die Silicagelschicht gedrückt. Das klare Filtrat kann anschließend sofort einer weiteren Nucleinsäurereinigung über Anionenaustauscher-Chromato-

- 9 -

graphie, Gelfiltration oder einer Fällung mit Alkohol unterzogen werden.

Die Filterschicht mit den Zellbruchstücken wird verworfen.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Filtrationsverfahren zur Präparation von Nucleinsäuren aus natürlichen Quellen, wobei
  - die nucleinsäurehaltigen Quellen aufgeschlossen werden,
  - der Aufschluß für einen Zeitraum ruht,
  - der resultierende Aufschluß eine Filterschicht aus Glas, Silicagel, Aluminiumoxid oder geschütteter Diatomeenerde oder verwebten oder verklebten Vliesen aus Glasfasern und Silicagel sowie Cellulose, Papier, gepreßtem Papier, Vliesen aus Papier oder auch Partikel oder Schichten, Membranen oder Kunststoffe, wie non woven fabrics, basierend auf Polypropylen, passiert, die aus der Filterschicht austretende Fraktion aufzufangen wird und
  - anschließend die Nucleinsäure aus der aufgefangenen Fraktion isoliert und gereinigt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Filterschichten so modifiziert sind, daß keine Affinität zur Nucleinsäuren besteht, insbesondere durch Hydroxyl-Gruppen tragende Mineralien oder beschichtete Mineralien, insbesondere Diol-Silicagel, Diol-Diatomeenerde und/oder Diol-Perlite oder unter Bedingungen, bei denen Silicagel keine Affinität zu NA besitzt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, wobei die Passage des Aufschlusses durch Überdruck, ausgeübt auf der Seite der Filterschicht, die vor der Passage liegt, oder Unterdruck ausgeübt, auf der Seite der Filterschicht, die nach der Passage liegt, erleichtert wird.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Filterschicht aus unbehandelter Diatomeenerde oder Diol-Diatomeenerde mit Fließwerten von 0,1 bis 15 Darcy besteht.

- 11 -

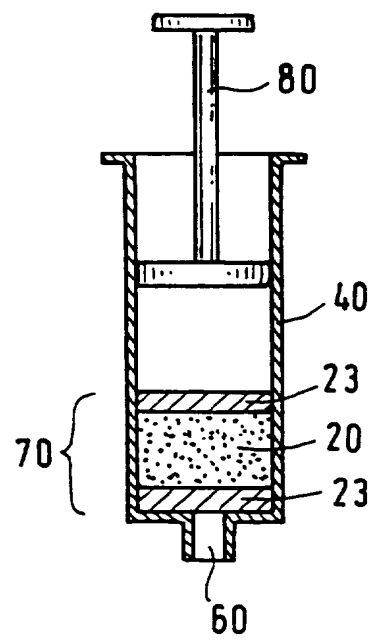
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die nucleinsäurehaltigen Quellen Zellen aus Zellkulturen, Geweben jedweder Art, Körperflüssigkeit, Mikroorganismen sind.
6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die zu reinigenden Nucleinsäuren Plasmid-DNA, Cosmid-DNA, insbesondere für die molekular-biologische Forschung, wie Klonierung und Sequenzierung sind, Plasmid-DNA zur Gentherapie, genomische DNA zur Analyse, Diagnostik und Gentherapie und/oder virale Nucleinsäuren sind.
7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Filterschicht in einem Hohlkörper angeordnet ist.
8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Filterschicht in einem Hohlkörper zwischen zwei Fixierungseinrichtungen angeordnet ist.
9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Filterschicht in einem Spritzenkörper zwischen zwei porösen Einrichtungen, wie Glas- oder Kunststofffritten, angeordnet ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 und/oder 9, wobei der Überdruck auf der Seite vor der Passage durch die Filterschicht mittels eines Kolben ausgeübt wird.
11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei nach der Filterung weitere Aufarbeitungsschritte angeschlossen werden, wie Trennung an Anionenaustauschern.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei zur Reinigung der Nucleinsäure weitere Verfahrensschritte erfolgen, wie

- 12 -

Adsorption der Nucleinsäure an Silicagel oder Glasfasern.

13. Zusammenstellungen enthaltend Vorrichtungen zur Durchführung des Verfahrens, wie Einmalspritzen, in denen die Filterschicht angeordnet ist, weiteres chromatographisches Hilfsmaterial, wie Anionenaustauschersäulen oder Säulen, die Silicagel- oder Glasfaserschichten zur nachträglichen Reinigung der Nucleinsäuren nebst den dazu benötigten Puffern enthalten.
14. Zusammenstellungen nach Anspruch 13, in denen Filter mit Anionenaustauscher zur Plasmid-DNA-Präparation und/oder Cosmid-DNA-Präparation enthalten sind.

- 1 / 1 -



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 95/00392

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07H1/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US,A,4 923 978 (MCCORMICK RANDY M) 8 May 1990 see the whole document ---	1, 13
A	EP,A,0 268 946 (DIAGEN GMBH) 1 June 1988 see the whole document ---	1, 13
A	EP,A,0 442 026 (TALENT SRL) 21 August 1991 see the whole document ---	1, 13
A	US,A,5 004 806 (KUNG VIOLA T) 2 April 1991 see the whole document -----	1, 13

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 January 1996

Date of mailing of the international search report

07.02.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 95/00392

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-4923978	08-05-90	AU-B- 625639 AU-B- 3352589 AU-B- 632284 WO-A- 9010637	16-07-92 09-10-90 24-12-92 20-09-90
EP-A-0268946	01-06-88	DE-A- 3639949 DE-D- 3787445 DE-T- 3787445 JP-B- 7013077 JP-A- 63150294 US-A- 5057426	09-06-88 21-10-93 07-07-94 15-02-95 22-06-88 15-10-91
EP-A-0442026	21-08-91	IT-B- 1240870 AT-T- 132158 AU-B- 7029691 CA-A- 2019911 JP-A- 5015373	17-12-93 15-01-96 15-08-91 14-08-91 26-01-93
US-A-5004806	02-04-91	NONE	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PL./EP 95/00392

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C07H1/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US,A,4 923 978 (MCCORMICK RANDY M) 8.Mai 1990 siehe das ganze Dokument ---	1,13
A	EP,A,0 268 946 (DIAGEN GMBH) 1.Juni 1988 siehe das ganze Dokument ---	1,13
A	EP,A,0 442 026 (TALENT SRL) 21.August 1991 siehe das ganze Dokument ---	1,13
A	US,A,5 004 806 (KUNG VIOLA T) 2.April 1991 siehe das ganze Dokument -----	1,13

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. Januar 1996

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07.02.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreno, C

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/00392

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A-4923978	08-05-90	AU-B- 625639 AU-B- 3352589 AU-B- 632284 WO-A- 9010637	16-07-92 09-10-90 24-12-92 20-09-90
EP-A-0268946	01-06-88	DE-A- 3639949 DE-D- 3787445 DE-T- 3787445 JP-B- 7013077 JP-A- 63150294 US-A- 5057426	09-06-88 21-10-93 07-07-94 15-02-95 22-06-88 15-10-91
EP-A-0442026	21-08-91	IT-B- 1240870 AT-T- 132158 AU-B- 7029691 CA-A- 2019911 JP-A- 5015373	17-12-93 15-01-96 15-08-91 14-08-91 26-01-93
US-A-5004806	02-04-91	KEINE	